

Neuere Ergebnisse und Erwägungen zur Theorie u. Technik der Weigert-schen Markscheidenfärbung

von Dr. A. GELLÉRT und Dr. P. BACSICH, Assistenten.

Die empirisch-praktisch vollkommen ausgearbeiteten mikrotechnischen Methoden erhalten meist erst später ihre physikochemische Erklärung. Nicht selten lassen sich die einzelnen Methoden in ihren Einzelheiten nicht genau beschreiben, die Angaben des Fachschrifttums weisen dann bloß nach einer bestimmten Richtung hin, die sich aber unserer speziellen Arbeit anzupassen hat.

Neben *Größe* und *Natur* einer Arbeit wird diese Anpassung noch von 2 anderen Faktoren bestimmt: Einerseits durch das *Milieu* in dem die Arbeit verrichtet wird, andererseits durch die nicht immer gleichmäßige *Zusammensetzung der Chemikalien*. Nach unseren neuesten Untersuchungen (Bacsich 1932.), sind sogar die zu verschiedenen Zeitpunkten von ein und derselben Fabrik gelieferten Materialien nicht immer gleichwertig. Diese Gründe machen begreiflich, daß die geniale WEIGERT-sche Markscheiden-Färbung seit ihrer Erfindung so vielen erfolgreichen und erfolglosen Modifikationen unterworfen wurde, so daß sie heute über eine sozusagen eigene Literatur verfügt.

Obzwar die Grundlagen der verschiedenen Modifikationen nahezu unverändert geblieben sind, konnte auch durch die vorliegenden Untersuchungen nachgewiesen werden, daß in bezug auf ihren praktischen Wert große Unterschiede bestehen. Die einen sind schwerer, die anderen leichter durchzuführen. Der eine Teil eignet sich mehr für das zentrale, der andere mehr für das periphere Nervensystem. Bei unseren vergleichenden Untersuchungen waren wir auf der Suche nach einer Methode, die folgenden Anforderungen nach Möglichkeit entspricht. Wir stellten uns folgende Fragen:

1. Welches Verfahren eignet sich am ehesten zur Untersuchung der peripherischen Nerven?

2. Bei welchem Verfahren kann man die Verteilung der markhaltigen und marklosen Fasern am deutlichsten erkennen?

3. Welches ist das einfachste und dabei am meisten verläßliche Verfahren?

4. Bei welchem Verfahren ist es möglich, größere Mengen des Untersuchungsmaterials auf einmal zu verarbeiten?

Von bekannten Verfahren entsprach unseren Anforderungen noch am ehesten die WEIGERT-PAL-sche Methode. Wir waren demnach bestrebt, dieses Verfahren möglichst vollkommen den oben genannten Anforderungen anzupassen, was uns, wie aus den weiteren Ausführungen zu ersehen ist, einwandfrei gelungen ist.

1. *Materialentnahme.* Die Entnahme des Untersuchungsmaterials wurde, um etwaige Quetschungen, die das spätere Bild zerstören würden, nach Möglichkeit zu vermeiden, mit äußerster Vorsicht ausgeführt. Das so entnommene Material wurde dann samt den mit Tusche beschriebenen Papiernummern in Tüll eingewickelt und möglichst rasch in die Fixierlösung gebracht, damit nicht infolge der Austrocknung (Tüll ist sehr hygroskopisch) die feinere Struktur zerstört werde.

2. *Fixieren.* Zum Fixieren wurde über Kreidepulver neutralisiertes 4%-iges (10 : 100) Formol in reichlicher Menge verwendet. Die Neutralisierung ist wegen der durch etwaige Zersetzung des Formalins entstehenden Ameisensäure unbedingt vorzunehmen, da die quellende Wirkung der Ameisensäure die feinere Struktur der dünnen Markscheiden leicht zerstören kann.

3. *Auswaschen.* Nach dem Fixieren wurden mehrere (15—20) Tüllsäckchen zusammen in einen größeren Tüllsack gepackt und in fließendem Wasser 12—24 Stunden gewässert. Die lange Wässerung ist wegen der reduzierenden Wirkung des Formalins unbedingt angezeigt. Etwaige Spuren von Formalin könnten das nachfolgende Beizen sehr erschweren.

4. *Beizen.* Gebeizt wird 4—8 Tage lang bei 36° C in der heute nur selten benutzten original Weigert-schen Markscheidenbeize. Mit 100 ccm. einer 5%-igen Kalium-bichrom.-Lösung werden bei Erwärmung 2.5 gr. Fluorchrom vermengt und das

Gemenge nach seinem Erkalten filtriert. Diese Art der Beizung ist u. E. bedeutend vorteilhafter als das gewöhnliche Beizen mit Kalium bichrom. Erstens braucht man viel weniger Zeit, zweitens wird das Material viel weniger brüchig, was beim Schneiden ein sehr großer Vorteil ist, drittens erscheinen die so erhaltenen Markscheidenringe viel deutlicher, was besonders bei dünnmarkigen Fasern kein geringer Vorteil ist.

Der *Wirkungsmechanismus* der Chrombeize kann auf Grund unserer Versuche folgendermaßen erklärt werden:

Die Markscheiden werden durch die Chromsalze, zu denen sie eine ganz besondere Affinität zeigen, soweit oxydiert, daß sie von fettlösenden Substanzen nicht mehr oder nur in sehr geringem Maße angegriffen werden. Das oxydierte Myelin behält die gebundenen Chromsalze auch während des späteren Auswaschens und während der Einbettung. Die anderen Gewebe geben sie schon beim Waschen ab. Die Chromsalze bleiben also nur an den, den Markscheiden entsprechenden Gebieten haften, so daß die schwarze Lackfärbung durch Hämatoxylin nur an diesen Stellen zustande kommt. Die Myelinsubstanz nimmt an der Färbung nicht aktiven Anteil, sie spielt nur die Rolle eines Vehikels. Diese Behauptung wird auch durch die Tatsache bewiesen, daß bei Gefrierschnitten die Markscheiden vor dem Chromieren nicht zu färben sind. *Wir färben also nicht die Markscheiden selbst, sondern die in ihnen suspendierten Chromsalze.*

5. *Auswaschen.* 6—8 Stunden in fließendem und dann in öfters gewechselttem stehenden Wasser, bis sich dieses nicht mehr färbt. Im Verlaufe der Untersuchungen zeigte sich keine beeinträchtigende Wirkung durch das Auswaschen in Wasser statt in Alkohol, daher kann der überflüssige Alkoholverbrauch wegefallen.

Die Schonung des Materiales vor Lichteinwirkung während des Auswaschens und des Einbettens ist überhaupt nicht nötig, obzwar WEIGERT sehr zu dieser Vorsicht rät. Er dachte dabei an irgendeine photochemische Reaktion, vielleicht an einen metallischen Niederschlag von Chrom. Wir haben aber zu dieser Annahme keinen chemischen Grund und wenn auch eine solche Ausfällung zustande kommen sollte, wäre sie im Sinne von Punkt 4, sogar vorteilhaft zu nennen.

6. *Einbettung*. Es ist bekannt, daß durch die allgemein gebräuchliche Einbettung mittels abs. Alkohol besonders das bindegewebsreiche Untersuchungsmaterial und somit auch die peripherischen Nerven hart und brüchig werden. Die Kalium-Bichromat und auch die Fluor-Chrombeize zeigen dieselbe Wirkung. Infolge dessen kommt es oft, besonders bei gleichzeitiger Einbettung größerer Massen, vor, daß von den größern peripherischen Nerven keine Schnitte angefertigt werden können, die sich zur feineren Untersuchung der marklosen Fasern eignen.

Teils aus den oben angegebenen Gründen, teils auch um Alkohol zu sparen, entschlossen wir uns zur Einbettung ohne absoluten Alkohol.

Eine ausführliche Beschreibung dieser Methode findet sich an anderer Stelle (BACSICH: Neuere Ergebnisse mit der Einbettung ohne abs. Alkohol. Zeitschr. für wiss. Mikr. Bd. 49. 1932.). Hier wollen wir bloß die Grundzüge der genannten Methode angeben. Die einzelnen aufeinander folgenden Glieder der Einbettungsreihe (96%-iger Alkohol — Chloroform — Benzol) sind so gewählt, daß sie miteinander ohne Niederschlag vermengbar sind. Diese Zusammensetzung ist auch nach APÁTHY eine Hauptforderung der erfolgreichen Einbettung. Außer dem enthält die Reihe von 96%-igem Alkohol aufwärts 5% Carbol-säure, wodurch die Belastungsfähigkeit der Reihe außerordentlich steigt.

Vom allgemeinen Gebrauch abweichend wurde das Untersuchungsmaterial nicht einfach in Celloidin, sondern doppelt in Paraffin-Celloidin eingebettet. Zu diesem Vorgehen wurden wir durch folgenden Umstand veranlaßt: Werden die Markscheiden nach der vorangegangenen Celloidin Einbettung noch in 48°-iges Paraffin gebracht, dann schrumpfen sie sozusagen nicht mehr. Man erhält demnach auf diese Weise auch bei einem großen Teile des Materials gut haltbare, gleichmäßige Schnitte, die sich wenn es nötig ist, auch zur Serienuntersuchung ausgezeichnet eignen (z. B. bei der Fasernanalyse). Diese Schnitte können nach Lösung des Paraffins auch einfach als Celloidinschnitte gefärbt werden.

Die Einbettung in Celloidin kann noch im Tüllsack vorgenommen werden. Dies ist aber bei der Paraffineinbettung

sehr schwierig. Um auch diese Einbettung übersichtlich zu gestalten, werden die durch Chloroform gehärteten Celloidin-Blöcke mit flüßigem Celloidin zur Vermeidung von Verwechslungen auf Papierstreifen aufgeklebt, die ebenfalls mit Tusche beigezeichnet werden können. Dadurch spart man viel Mühe, hat das Material leicht vor Augen und kann seine Aufhellungen oder Trübungen in den Intermedien kontrollieren. Eigenartigerweise wird auch das dünnste Papier in den Intermedien steif und pergamentartig, so daß die Blöcke bei gutem Aufkleben sich sozusagen nie loslösen. Diese Methode kann man auch bei der Doppeleinbettung des mit Osmium behandelten Nervenmaterials benützen.

Bei der Paraffineinbettung wurden als Intermedien Chloroform, Benzol und Xylol in der angegebenen Reihenfolge verwendet. Das Sinken der anfangs im Chloroform schwimmenden Blöcke ist ein zuverlässiges Zeichen für das Verschwinden des Alkohols. Die Trübung innerhalb des gegen Wasser sehr empfindlichen Xylols deutet auf eine Erschöpfung der Einbettungsreihe hin. Dadurch wurden wir davor geschützt, wasserhaltiges Material in Paraffin zu betten, wodurch die Blöcke unbrauchbar geworden wären.

Auf den ersten Blick erscheinen diese Vorsichtsmaßregeln etwas übertrieben, erweisen sich aber insofern als unbedingt angebracht, wenn man bedenkt, daß von unseren fast 2000 Blöcken, die wir zur Untersuchung der Hirnnerven in 10 Monaten verbrauchten, nicht einer unbrauchbar war.

7. *Schneiden.* Nach der Einbettung (bei Doppeleinbettung verweilen die Blöcke etwa 8—12 Stunden in 48°-igem Paraffin) werden die Blöcke in Wasser gebracht, in dem sich das Paraffin schnell erhärtet. Beim Schneiden wird das Messer in die allgemein gebräuchliche Stellung für doppelt eingebettete Blöcke gebracht. Das entfettete und mit Eiweiß-Glycerin bestrichene Messer wird mit 30%igem Alkohol befeuchtet. Mit wenigen Abweichungen arbeiteten wir durchschnittlich mit einer Schnittdicke von 12 Mikron.

A) Die für Serien bestimmten Schnitte werden auf die entfetteten (Aether-Alkohol) und mit Eiweiß-Glycerin bestrichenen Objektträger gelegt. Bisher mußte man oft mit dem unliebsamen Umstand rechnen, daß die Schnitte während des

Arbeitens mit der Weigert-schen Färbung zum großen Teil von den Objektträgern abrutschen. Diese äußerst unangenehme Erscheinung kann durch das dicke Bestreichen der vollkommen entfetteten Objektträger mit Eiweiß-Glycerin vermieden werden; es kommt dadurch zu keinerlei Störung, denn die vom Eiweiß aufgenommene Farbe wird im Laufe der Differenzierung wieder abgegeben. Das im Thermostaten etwa noch nicht geronnene Eiweiß wird vor der Lösung des Paraffins und Cellodins in abs. Alkohol erhärtet. Um das Abrutschen der Schnitte vollends unmöglich zu machen, behandelt man die Präparate nicht in üblicher Weise vertikal, da die Schnitte so auch wegen ihres eigenen Gewichtes abrutschen können, sondern horizontal; da-

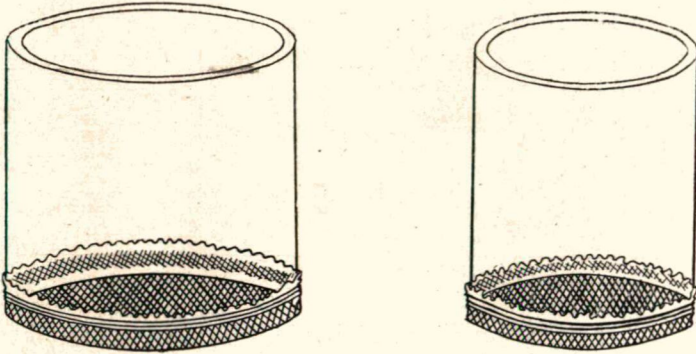


Abb.
Färbekörbchen.

mit wird dieser Nachteil der Weigert-schen Methode gegenüber der Osmium-Behandlung vollkommen ausgeglichen.

B) Um eine größere Menge von Präparaten auf einmal färben zu können, benützten wir die schon fast vergessenen, zuerst von APÁTHY bei der Einbettung angewendeten Glas-körbchen (Abb.). Diese bestehen aus einem 3—4 cm hohen Glasrohr mit einem Durchmesser von 2—3 cm, das am Ende mit Tüll abgeschlossen ist. Die 15—20 Schnitte, die aus einem Block angefertigt werden, kommen zusammen in einen solchen Korb. Um auch hier eine Verwechslung zu verhindern, legt man auch hier ein mit Tusche beschriebene Papiernummer zwischen die Schnitte. Nebenbei sei noch bemerkt, daß durch das Aufeinanderlegen der Schnitte kein Schaden entsteht.

Das Lösen des Paraffins und das Färben geschieht in größeren Gefäßen in denen 20—30 Körbe Platz haben. Auf diese Weise bringt man das Material durch die ganze Färbereihe bis zum Carbol-Xylol ohne es einem mechanischen Insult ausgesetzt zu haben. Die Lösung des Paraffins wird nicht mit dem teureren Benzol oder Xylol, sondern mit Hilfe folgender Mischung ausgeführt:

5 Teile Benzin,

1 Teil Benzol,

5% krist. Carbolsäure.

Diese Mischung hat neben ihrer Billigkeit noch den Vorteil, daß sie bedeutend schneller arbeitet, eine größere Menge Paraffin löst und infolge ihres Carbolsäuregehaltes auch viel mehr Wasser aufnehmen kann. (Wir hätten eigentlich die Lösung auch mit einer Mischung von Carbol-Benzin vornehmen können, da aber die Carbolsäure sich in Benzin nicht löst, waren wir gezwungen der Lösung 20% Benzol beizumischen.) Aus dieser Mischung können die Schnitte in 96%-igen Alkohol gebracht werden, ohne daß der geringste Niederschlag entsteht.

8. *Färbung.* Bei der Färbung hielten wir uns in den Grundzügen an die Anordnungen von PAL, von denen wir nur bei der Differenzierung abgewichen sind. Die PAL-sche Färbemethode hat zahlreiche Gegner, so auch WEIGERT, der behauptet, daß man erst in der zweiten Phase der Differenzierung erfährt, ob das Ka. hypermanganicum nicht zu stark eingewirkt hat. LANDAU hält diese Färbemethode für sehr kompliziert. Es scheint aber, daß diese Bedenken übertrieben sind. Wenn wir uns an die von uns erprobten Differenzierungszeiten hielten, so kam es sozusagen nie vor, daß einer der 15—20 Schnitte in einem Körbchen überdifferenziert wurde.

Der Gang der Färbung kurz zusammengefaßt:

a) 24 Stunden lang in der WEIGERT-schen Lithium-Hämatoxylinlösung bei Zimmertemperatur färben. Die Zusammensetzung der Farblösung ist folgende:

10 ccm einer 10%igen alkoholischen Lösung von altem Hämatoxylin.

7 ccm konzentrierter wässriger Lithiumcarbonat-Lösung.

93 ccm Aqua dest.

Sollte das Hämatoxylin nicht vollständig reif sein, so kann es

mit einigen Tropfen Hydrogen-Superoxyd sofort gebrauchsfähig gemacht werden.

b) Auswaschen der Präparate in reichlichem, öfters gewechseltem Leitungswasser.

c) Die Präparate auf **15—20** Minuten in $\frac{1}{4}\%$ -ige Kalium-Hpermanganicum-Lösung legen.

d) Auswaschen nach Punkt b).

e) **15—20** Minuten lang differenzieren in einer Lösung von 1%-iger Oxalsäurelösung und 1%-igem Kaliumsulfid zu gleichen Teilen. Das Verschwinden der Färbung aus den eingelegten Papiernummern ist ein verlässliches und genaues Zeichen der beendeten Differenzierung.

f) Gründliches Auswaschen wie bei b).

g) Einlegen in destilliertes Wasser auf 1—2 Minuten.

h) Einlegen in 70%-igen Alkohol auf 1—2 Minuten.

i) Einlegen in 96%-igen Alkohol auf 1—2 Minuten.

j) Färben 1—2 Minuten lang in einer 0.5%-igen alkoholischen Eosin-Lösung. Um die Färbungsfähigkeit der Eosin-Lösung zu steigern, wird sie mit 1—2 Tropfen Eisessig angesäuert. Nebenbei sei bemerkt, daß wir diese saure Eosin-Lösung auch zum Nachfärben der sich mit Eosin sehr schwer färbenden Osmium Präparate benützten.

k) 5—10 Minuten lang differenzieren in 96%-igem Alkohol. Im Falle der gut gelungenen Differenzierung erscheinen die marklosen Nervenfasern als helle Felder im rosafarbenen Bindegewebe.

l) Klären mit Carbol-Xylol und endlich Abschließen mit Canadabalsam.

Bei unseren Untersuchungen kam es öfters vor, daß wir um eine inzwischen aufgetauchte Frage rasch zu lösen, von der 3—4 Wochen dauernden Methode abweichen mußten. Zu diesem Zwecke standen uns drei Verfahren zur Verfügung:

A) Das nach WEIGERT gebeizte Untersuchungsmaterial wurde nach der von Bacsich (1932) vorgeschlagenen Paraffin-Schnelleinbettungsmethode eingebettet. Die so erhaltenen Schnitte wurden nach Durchführung des in Punkt 7. gesagten gefärbt.

Im Gegensatz zu vielen Autoren, die die Paraffin-Einbettung für die Weigert'sche Markscheidenfärbung geradezu für

schädlich halten, müssen wir bemerken, daß die auf diese Weise in 8—10 Tagen erhaltenen Präparate verhältnismäßig ausgezeichnet gelangen. Sie sind in ihren Einzelheiten leicht erkennbar und zeigen auch in den Feinheiten nur eine geringe Abweichung von den doppelt eingebetteten Präparaten.

B) In etwas eiligeren Fällen betteten wir das fixierte Material nach HERINGA in Gelatine und färbten die Gefrierschnitte nach einer 24 stündigen Beizung in Fluor-Chrom bei 36° C, in der gewohnten Weise. Unsere Methode war einesteils wegen der Gelatineeinbettung, die das Auseinanderfallen der Nervenfasern verhindert andernteils wegen der außerordentlich schonungsvollen Behandlung in den Färbekörbchen, da jede Verletzung vermieden wurde, verhältnismäßig verlässlich. Es ist nicht von der Hand zu weisen, daß die so gewonnenen Präparate weit verlässlicher sind als die gleichen von SPIELMEYER, SOKOLANSKY u. a., die weder die Gelatine-Einbettung, noch die Korbmethode benützten. Dieses Verfahren lieferte in 4 Tagen in jeder Hinsicht zufriedenstellende, gut erkennbare Präparate.

C) Manchmal war auch diese Zeit zu lang, besonders wenn wir uns von der Brauchbarkeit eines Nervenmaterials in kurzer Zeit überzeugen wollten. In diesen Fällen wurden die Gefrierschnitte, die mit Hilfe der Gelatine-Einbettung angefertigt worden waren, mit Sudan III. gefärbt. Es ist bekannt, daß Sudan III. die Markscheiden bloß gelblich färbt, was natürlich kein gut erkennbares Bild gibt. In eigenen Versuchen, die an anderer Stelle erscheinen sind (BACSICH 1932), fanden wir, daß die Färbefähigkeit des Sudans durch eine Beimengung von Carbonsäure außerordentlich steigt. Nach der Färbung mit der nach unserem Verfahren bereiteten alkoholischen Carbol-Sudanlösung wurden die Präparate noch schwach mit Hämatoxylin nachgefärbt. Die nun auf hellblauem Untergrund leuchtend rot erscheinenden Markscheidenringe, konnten in allen Fällen sehr deutlich wahrgenommen werden.

Zusammenfassung.

Aus unseren Ergebnissen geht hervor, daß die Weigert-Pal-sche Technik nach unseren entsprechenden Modifikationen, den eingangs gestellten Anforderungen in jeder Richtung entspricht: 1. Die Vermeidung der teuren Alkohol-Auswaschung,

2. der Beweis der Unempfindlichkeit des Untersuchungsmaterials gegen Licht, 3. die Anwendung der Doppeleinbettung; 4. die mitunter notwendige Abkürzung des Vorganges durch Anwendung unserer Paraffin-Schnelleinbettung, 5. die Möglichkeit der Herstellung von Serienschnitten, 6. gleichzeitiges Färben einer größeren Anzahl von Präparaten in Glaskörbchen, 7. Ausschluß der Gefahr einer Überdifferenzierung, — dies alles sind Komponenten, durch welche die Güte der Präparate gehoben, ihre Herstellung vereinfacht und verbilligt und ihre Verlässlichkeit gesteigert werden konnte.

Literatur.

- Bacsich, P.*: 1932. Histologische Einbettung ohne abs. Alkohol. (Ungarisch.) Orvosi Hetilap.
- 1932. Neuere Ergebnisse mit der Einbettung ohne absoluten Alkohol. Ztschr. f. wiss. Mikr. B. 49.
- 1932. Theoretische und praktische Beiträge zur Untersuchung der Zellen der peripherischen Ganglien. Siehe d. Band. S. 27.
- 1932. Untersuchungen über den Fettgehalt der Leukozyten. Fettfärbungsmethode in den Leukozyten. (Ungarisch.)
- Benda, C.*: 1903. Markscheidenfärbung der peripherischen Nerven.
- Fränkel, E.*: 1903. Über eine neue Markscheidenfärbung. Neurol Ctrbl. Bd. 22. S. 766.
- Gudden, H.*: Über die Anwendung elektiver Färbemethoden am in Formol gehärteten Nervensystem. Neurol. Ctrbl. Bd. 16. S. 24.
- Krause, R.*: 1927. Enzyklopädie der mikroskopischen Technik. Bd. III. S. 1622.
- Landau, E.*: 1923. Über einige Vereinfachungen in der Markscheidenfärbung. Ztschr. f. wiss. Mikr. Bd. 40. S. 22.
- 1925. Zur Frage der Markscheidenfärbung ohne primäre Beizung. Ebenda Bd. 42. S. 180.
- Mosse, M.*: 1901. Über Silberimprägnation der Nervenzellen und der Markscheiden. Arch. Mikr. Anat. Bd. 59. S. 401.
- Romeis, B.*: 1928. Taschenbuch der Mikroskopischen Technik. 12. Auflage.
- Sokolansky, G.*: 1930. Methode einer schnellen Färbung von Markscheiden in Gefrierschnitten. Ztschr. f. wiss. Mikr. Bd. 47. S. 321.
- Spielmayer, W.*: 1924. Technik der mikr. Untersuchung des Nervensystems. 3. Aufl.
- Strong, O. S.*: 1903. Notes on the of Weigerts method for staining medullated nerve-fibers. Journ. Comp. Neurol. Vol. 13. S. 291.

